

(19) 日本国特許庁 (J P)

再公表特許 (A 1)

(11) 国際公開番号

W O 9 9 / 1 0 3 8 5

発行日 平成14年8月13日 (2002. 8. 13)

(43) 国際公開日 平成11年3月4日 (1999. 3. 4)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z

A 6 1 L 15/16

A 6 1 L 27/00

G

27/00

31/00

B

31/00

15/01

審査請求 有

予備審査請求 有

(全 40 頁)

出願番号 特願2000-507710(P2000-507710)
 (21) 国際出願番号 P C T / J P 9 8 / 0 3 5 3 6
 (22) 国際出願日 平成10年8月7日 (1998. 8. 7)
 (31) 優先権主張番号 特願平9-226734
 (32) 優先日 平成9年8月22日 (1997. 8. 22)
 (33) 優先権主張国 日本 (J P)
 (31) 優先権主張番号 特願平10-117564
 (32) 優先日 平成10年4月27日 (1998. 4. 27)
 (33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 電気化学工業株式会社
 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号
 (72) 発明者 宮田 喜明
 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化
 学工業株式会社 総合研究所内
 (72) 発明者 岡本 彰夫
 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化
 学工業株式会社 総合研究所内
 (72) 発明者 川田 正寿
 東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化
 学工業株式会社 総合研究所内
 (74) 代理人 弁理士 小川 利春 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸ゲルとその製造方法及びそれを含有する医用材料

(57) 【要約】

(1) 中性水溶液に難溶性であることを特徴とするヒアルロン酸単独で形成されたゲル、(2) 中性の25℃の水溶液中で1日以上形態を保持することを特徴とする

(1) 記載のヒアルロン酸ゲルを構成とする。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 中性水溶液に難溶性であることを特徴とするヒアルロン酸単独で形成されたゲル。

【請求項 2】 中性の 25℃の水溶液中で 1 日以上形態を保持することを特徴とする請求項 1 記載のヒアルロン酸ゲル。

【請求項 3】 中性の 25℃の水溶液中で 1 日での溶解率が 50%以下であることを特徴とする請求項 1 記載のヒアルロン酸ゲル。

【請求項 4】 中性の 37℃の水溶液中で 12 時間での溶解率が 50%以下であることを特徴とする請求項 1 記載のヒアルロン酸ゲル。

【請求項 5】 ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が 0.5 以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする請求項 1 記載のヒアルロン酸ゲル。

【請求項 6】 ヒアルロン酸の pH 3.5 以下の水溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする請求項 1 記載のヒアルロン酸ゲル。

【請求項 7】 ヒアルロン酸の水溶液を、pH 3.5 以下に調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも 1 回行うことを特徴とする請求項 6 記載のヒアルロン酸ゲルの製造方法。

【請求項 8】 次の (a)、(b) の要件を満たすヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする医用材料。

(a) 中性の 25℃の水溶液中で 1 日での溶解率が 50%以下である、(b) ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が 0.5 以上の分子量フラクションを部分的に含む。

【請求項 9】 ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、シート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択した 1 種であることを特徴とする請求項 8 記載の医用材料。

【請求項 10】 中性の 25℃の水溶液中で 1 日での溶解率が 50%以下であり、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶

化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクションを部分的に含むヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む医用材料。

【請求項11】 シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状であるヒアルロン酸単独で形成されたヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む医用材料。

【請求項12】 医用材料が癒着防止剤であることを特徴とする請求項8～11のいずれか1項に記載の医用材料。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、新規なヒアルロン酸ゲル及びその製造方法に関し、更に特にそれらの生体適合性の良好な医用材料に関する。

背景技術

ヒアルロン酸は、 β -D-N-アセチルグルコサミンと β -D-グルクロン酸が交互に結合した直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は哺乳動物の結合組織に分布するほか、ニワトリのとさか、連鎖球菌の夾膜などにも存在が知られている。ニワトリのとさか、臍帯等が抽出材料として用いられているほか、連鎖球菌の培養物からも精製物が調整されている。

天然産のヒアルロン酸は、分子量について多分散性であるが、種及び臓器特異性をもたず、生体に移植または注入した場合であっても優れた生体適合性を示すことが知られている。さらに、生体に適用する場合のヒアルロン酸自体の易水溶性に由来する短所、例えば、生体内滞留時間が比較的短いことなどから、多種多様なヒアルロン酸の化学修飾物も提案されている。

これらの代表的なものとしては、ジビニルスルホン、ビスエポキシド類、ホルムアルデヒド等の二官能性試薬を架橋剤に使用して、得られた高膨潤性の架橋ヒアルロン酸ゲルを挙げることができる（米国特許第4, 582, 865号明細書、特公平6-37575号公報、特開平7-97401号公報、特開昭60-130601号公報参照）。

また、ヒアルロン酸のテトラブチルアンモニウム塩がジメチルスルフォキシド等の有機溶媒に溶解する特徴を利用したヒアルロン酸の化学的修飾方法が開示されている（特開平3-105003号）。また、ヒアルロン酸のテトラブチルアンモニウム塩をジメチルスルフォキシド中で、トリエチルアミンとヨウ化2-クロロ-1-メチルピリジニウムを加え反応させ、ヒアルロン酸のカルボキシル基と水酸基間でエステル結合を形成させる方法も開示されている（欧州特許0341745A1）。

また、共有結合を形成する化学的試薬を使用することなく、ヒアルロン酸を水に不溶化する方法として、ヒアルロン酸とアミノ基あるいはイミノ基を有する高

分子化合物とを、ヒアルロン酸のカルボキシル基と高分子化合物のアミノ基あるいはイミノ基をイオン複合体として結合させてヒアルロン酸高分子複合体を調製する方法が開示されている（特開平6-73103号公報参照）。

ヒアルロン酸水溶液を酸性、例えばpH2.0～2.7の範囲に調整するとパティーゲルと呼ばれるジェリー状に固化した状態のゲルを形成することは知られているが、pH2.0未満では、パティーゲルは形成されない。

そして、このパティーゲルを中性水溶液中に投入すると速やかに溶解するので、本発明でいうヒアルロン酸ゲルとは異なる。

また、ヒアルロン酸水溶液を、pH2.0～3.8、20～80重量%水溶性有機溶剤存在下におくことを特徴とするヒアルロン酸ゲルの製造方法も開示されている（特開平5-58881公報参照）。しかしながら、この製造方法で得られたヒアルロン酸ゲルは、コーティング等を施さない場合には、水中に投入すると溶解することが該公報に記載されている。

また、一般的には、高分子水溶液から、凍結、解凍させる操作を繰り返すことにより高分子ゲルを製造する方法も提案されている。これらの代表的なものとしては、ポリビニルアルコール、グルコマンナンを挙げることができる（特開昭57-190072号公報、特開平5-161459号公報参照）。

しかし、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸を含む生体試料を精製又は保存する際に、凍結、解凍させる操作や凍結乾燥は、一般的手法として多用されているが、通常は中性で管理されているため、このような方法でヒアルロン酸ゲルが形成されるという報告は未だない。

ヒアルロン酸は、極めて高い粘ちょう性と保湿性を有し、本質的に抗原性が無く生体適合性が高いため、変形性膝関節症の治療薬や眼科手術補助剤等に用いられている。

また、ヒアルロン酸溶液そのものを手術後の癒着防止剤として用いることも検討されているが、生体内での貯留性が比較的短いので効果が弱く、水溶性のため短時間で創面から拡散・流動してしまう（Journal of Gynecologic Surgery vol. 7 No. 2 97-101 (1991)）。

また、特表平5-508161号、特表平6-508169号を基にカルボジイミド類でカルボキシメチルセルロースとヒアルロン酸ナトリウムを架橋、修飾したフィルム状の癒着防止剤「Seprafilm」（Genzyme社製）が開発されている。

ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン性の高分子と複合体化することなく、生体適合性医用材料として使用可能な、生体内滞留時間が長いヒアルロン酸ゲルは未だ開発されていない。

本発明者らは、上記目的を達成するために、ヒアルロン酸自体の物理化学的性質を鋭意検討してきた。その結果、ヒアルロン酸の水溶液を特定のpHに調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも1回行うことによって、ヒアルロン酸ゲルが得られることを見出した。さらに、こうして得られたヒアルロン酸ゲルの水中での溶解速度が極めて遅いことも見出した。

また、従来法による改質ヒアルロン酸は、幾多の努力にもかかわらず化学的反応性物質を用いるため、新たな改質による毒性・生体不適合性等の危険性を本質的に抱え込まざるをえないという課題があった。

例えば、化学的修飾・架橋、及び金属塩などを用いるイオンの方法による、ヒアルロン酸癒着防止剤は、たとえ生体内の貯留性を改善できても、改質されたヒアルロン酸は架橋物質や金属などを共有結合やイオン結合でヒアルロン酸の分子中に内包するため、もはや天然ヒアルロン酸と構造が異なり、その生理作用や生体適合性、毒性を含む安全性が本質的にヒアルロン酸と同等であるとは言い難く、さらにこれら架橋剤等の残留毒性や、生体内に於ける分解産物に含まれる架橋剤の安全性の問題を完全に回避することは難しかった。

発明の開示

本発明者らは、本発明で得られたヒアルロン酸ゲルが医用材料として理想的な生体適合性、貯留性を有することを見出し、特に癒着防止剤として理想的な生体適合性、貯留性を有し、術後癒着を顕著に抑制することを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は、（１）中性水溶液に難溶性であることを特徴とするヒアルロ

ン酸単独で形成されたゲル、(2) 中性の 25℃の水溶液中で 1 日以上形態を保持することを特徴とする (1) 記載のヒアルロン酸ゲル、(3) 中性の 25℃の水溶液中で 1 日での溶解率が 50%以下であることを特徴とする (1) 記載のヒアルロン酸ゲル、(4) 中性の 37℃の水溶液中で 12 時間での溶解率が 50%以下であることを特徴とする (1) 記載のヒアルロン酸ゲル、(5) ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が 0.5 以上の分子量フラクションを部分的に含むことを特徴とする (1) 記載のヒアルロン酸ゲル、(6) ヒアルロン酸の pH 3.5 以下の水溶液を凍結し、次いで解凍して形成されることを特徴とする (1) 記載のヒアルロン酸ゲル、(7) ヒアルロン酸の水溶液を、pH 3.5 以下に調整し、該水溶液を凍結し、次いで解凍することを少なくとも 1 回行うことを特徴とする (6) 記載のヒアルロン酸ゲルの製造方法、(8) 次の (a)、(b) の要件を満たすヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする医用材料、(a) 中性の 25℃の水溶液中で 1 日での溶解率が 50%以下である、(b) ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が 0.5 以上の分子量フラクションを部分的に含む、(9) ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状からなる群より選択した 1 種であることを特徴とする (8) 記載の医用材料、(10) 中性の 25℃の水溶液中で 1 日での溶解率が 50%以下であり、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が 0.5 以上の分子量フラクションを部分的に含むヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む医用材料、(11) シート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、又はチューブ状であるヒアルロン酸単独で形成されたヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸を含む医用材料、(12) 医用材料が癒着防止剤であることを特徴とする (8) ~ (11) のいずれか 1 項に記載の医用材料である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものでも、また発酵法で製造したものでもその起源を問うことなく使用できる。

発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレプトコッカス属等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-100（微工研菌寄第9027号）、特開平2-234689号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-300（微工研菌寄第2319号）のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

ゲルとは、新版高分子辞典（朝倉書店 昭和63年）によれば、「あらゆる溶媒に不溶の三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体」と定義されている。理化学辞典（岩波書店 第4版 昭和62年）によれば、「ゾル（コロイド溶液）がジェリー状に固化したものの」と定義されている。

本発明でいうヒアルロン酸ゲルとは、中性水溶液に難溶性であることを特徴とし、このヒアルロン酸ゲルを中性水溶液中に投入すると、ゲル化していないヒアルロン酸と比較して有意の難溶性を示す。難溶性は、中性の25℃の水溶液中でのゲルの形態の保持とゲルの溶解率、及び中性の37℃の水溶液中でのゲルの溶解率で規定する。ここで、中性水溶液とは、pH7に調整された緩衝能を有する生理的食塩水である。

本発明でいうヒアルロン酸ゲルは、アルカリ性水溶液中、例えばpH11のアルカリ性緩衝水溶液中に投入すると速やかに溶解する特徴も有する。

本発明でいうヒアルロン酸ゲルとは、三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体である。三次元網目構造はヒアルロン酸の架橋構造によって形成されている。

本発明でいうヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで分解、可溶化することができる。可溶化されたヒアルロン酸が架橋構造を保持している場合、分岐点を有するヒアルロン酸として高分子溶液論的に直鎖状のヒアルロン酸と区別することができる。ヒアル

ロン酸自体は直鎖状の高分子であり、分岐構造を有さないことが知られている（多糖生化学1 化学編 共立出版 昭和44年）。

本発明でいうヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件としては、水溶液のpH 1.5、温度60℃が適当である。ヒアルロン酸のグリコシド結合の加水分解による主鎖切断反応力が、中性の水溶液中と比較して、酸性やアルカリ性の水溶液中で著しく促進されることはよく知られている（Eur. Polym. J. Vol 132, No 8, p 1011-1014, 1996）。更に酸加水分解反応は、反応温度が高い方が促進される。

本発明でいうヒアルロン酸ゲルの促進酸加水分解の反応時間は、ヒアルロン酸ゲルの構造、例えば原料ヒアルロン酸の分子量と分子量分布、架橋度によって大きく左右される。

可溶化されたヒアルロン酸の割合が大きく、分岐度が大きくなる反応条件を選択できる。反応条件が弱い場合は、可溶化されたヒアルロン酸の割合が小さく、逆に反応条件が強い場合は、可溶化されたヒアルロン酸の分子量が著しく小さくなるので、分岐度測定が困難になる。また、分岐点自体が分解する可能性も増大する。

反応条件は、目視で確認できるヒアルロン酸ゲルがほとんど消失する反応時間、または可溶化されたヒアルロン酸の割合が50%以上になる反応時間が好ましい。

可溶化されたヒアルロン酸の分子量と分岐度を測定する方法には、ゲルパーミエーションクロマトグラム（GPC）に検出器として示差屈折率計と多角度レーザー光散乱検出器（MALLS）を使うGPC-MALLS法、GPCに検出器として示差屈折率計と低角度レーザー光散乱検出器を使うGPC-LALLS法、あるいは、GPCに検出器として示差屈折率計と粘度計を使うGPC-粘度法がある。

本発明ではGPC-MALLS法を用い、GPCで分離された分子量フラクションの分子量と分岐度をオンラインで連続的に測定した。GPC-MALLS法では、GPCで分離された各フラクションの分子量と慣性半径を連続的に測定することができる。GPC-MALLS法では可溶化されたヒアルロン酸の各フラ

クションの分子量と慣性半径の関係を対照となる直鎖状ヒアルロン酸の各フラクションの分子量と慣性半径の関係を比較して分岐度を計算する慣性半径法と、同一溶出体積のフラクションの可溶化されたヒアルロン酸の分子量と対照となる直鎖状ヒアルロン酸の分子量を比較して分岐度を計算する溶出体積法がある。

本発明では、溶出体積法を使って分岐度の測定を行った。分岐度は可溶化されたヒアルロン酸の高分子鎖1コ当たりに存在する分岐点の数であり、可溶化されたヒアルロン酸の分子量に対してプロットされる。

各フラクションの分子量と慣性半径は、有限濃度におけるジムプロット(1)式を用いて、分子量は散乱角度 0° への外挿値、慣性半径は角度依存の初期勾配から、それぞれ以下の式に従って計算した。

$$\frac{Kc}{R(\theta)} = \frac{1}{MP(\theta)} + 2A_2c + \dots \quad (1)$$

$$P(\theta)^{-1} = 1 + \frac{1}{3} \cdot k^2 \langle S^2 \rangle + \dots$$

$$k = \frac{4\pi}{\lambda} \sin(\theta/2)$$

ここで、Mは分子量、 $\langle S^2 \rangle$ は平均2乗慣性半径、Kは光学定数、 $R(\theta)$ は散乱角度 θ における過剰還元散乱強度、 c は高分子濃度、 $P(\theta)$ は粒子散乱関数、 λ は溶液中でのレーザー光の波長、 A_2 は第2ビリアル係数でありヒアルロン酸では $0.002 \text{ ml} \cdot \text{mol} / \text{g}^2$ である。 c は示差屈折率計の出力から、ヒアルロン酸水溶液の屈折率の濃度勾配($dn/dc: 0.153 \text{ ml} / \text{g}$)を使って計算した。

GPC-MALLS法では、過剰還元散乱強度から分子量と平均2乗慣性半径を計算しており、測定精度は過剰還元散乱強度の大きさに依存する。(1)式から、過剰還元散乱強度は濃度と分子量両者の関数になる。試料の分子量に依存して、試料濃度と注入量を決定する必要がある。分子量フラクションに分別するG

P Cカラムの選択とともに、G P Cカラムへの濃度負荷が現れない範囲内で、最大の試料濃度と注入量を選択する。

溶出体積法による各フラクションの分岐度は、以下の(2)式に従って計算した。同一溶出体積のフラクションで、分岐高分子の分子量を M_b 、直鎖高分子の分子量を M_1 とすると、収縮因子 g が求まる。

$$g = (M_1 / M_b)^{(a+1)/e} \quad (2)$$

ここで、 a はMark-Houwink定数でヒアルロン酸では0.78である。 e は素抜け因子で1.0とした。

4官能性の長鎖無秩序分岐を仮定して、1本の高分子鎖上の分岐点の数 B (分岐度)は以下の(3)式から計算される。

$$g = \frac{1}{\left[\left(1 + \frac{B}{6} \right)^{0.5} \left(\frac{4B}{3\pi} \right)^{0.5} \right]} \quad (3)$$

溶出体積法による分岐度の計算方法はG P C-L A L L S法による分岐度測定と同じであり、その詳細は、サイズ排除クロマトグラフィー(共立出版 平成3年)に記載されている。

可溶化されたヒアルロン酸は、G P C溶媒で希釈して濃度を調製し、0.2 μ mのメンブランフィルターでろ過した後測定に供した。

本発明でいうヒアルロン酸ゲル中に、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造がある場合、可溶化されたヒアルロン酸に分岐構造が高分子溶液論的に確認される。

本発明でいうヒアルロン酸単独とは、ヒアルロン酸以外に化学的架橋剤や化学的修飾剤等は使用しないことまた、カチオン性の高分子と複合体化しないことを

意味するものである。

ヒアルロン酸の化学的架橋剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基、水酸基、アセトアミド基と反応して共有結合を形成する多価化合物であり、ポリグリシジルエーテル等の多価エポキシ化合物、ジビニルスルホン、ホルムアルデヒド、オキシ塩化リン、カルボジイミド化合物とアミノ酸エステルの併用、カルボジイミド化合物とジヒドラジド化合物の併用を例として挙げることができる。ヒアルロン酸と化学的架橋剤との反応により三次元網目構造が形成される。

ヒアルロン酸の化学的修飾剤は、ヒアルロン酸のカルボキシル基、水酸基、アセトアミド基と反応して共有結合を形成する化合物であり、無水酢酸と濃硫酸の併用、無水トリフルオロ酢酸と有機酸の併用、ヨウ化アルキル化合物を例として挙げることができる。ヒアルロン酸の親水性基を疎水化し、ヒアルロン酸の水溶性が減少する。

ヒアルロン酸と複合体化するカチオン性の高分子は、ヒアルロン酸のカルボキシル基と高分子化合物のアミノ基あるいはイミノ基の間でイオン複合体を形成する高分子であり、キトサン、ポリリジン、ポリビニルピリジン、ポリエチレンイミン、ポリジメチルアミノエチルメタクリレートなどを例として挙げることができる。ヒアルロン酸とカチオン性の高分子は複合体化することにより、水に不溶化する。

一方、ヒアルロン酸への架橋構造の導入やヒアルロン酸の不溶化、難溶化に直接関係しない物質を、本発明でいうヒアルロン酸ゲルを形成させる際に添加することはできる。ヒアルロン酸と同様に生体適合性に優れる材料、例えば、コンドロイチン硫酸、カルボキシメチルセルロース等を混合、複合化してヒアルロン酸ゲルを形成させることができるものであり、何ら制限されないものである。

また、ヒアルロン酸ゲルを形成させる際に、薬学的又は生理学的に活性な物質を添加して、これらを含有するヒアルロン酸ゲルを形成させることもできるものであり、何ら制限されないものである。

本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量は、約 1×10^5 ～ 約 1×10^7 ダルトンの範囲内のものが好ましい。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等をして得た低分子量のものでも同

様に好ましく使用できる。

なお、本発明にいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

本発明に用いられるヒアルロン酸の水溶液は、ヒアルロン酸の粉末と水を混合し、攪拌して得られる。このヒアルロン酸の濃度は5.0重量%以下が水溶液の処理上好都合である。

分子量が 2×10^6 ダルトン以上のヒアルロン酸を使用する場合は、濃度は2.5重量%以下が好ましい。

ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整するために使用する酸は、pH3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。

ヒアルロン酸の水溶液のpHは、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化するpHに調整する。酸型のヒアルロン酸の解離の平衡定数は、ヒアルロン酸濃度の無限希釈のとき $\log K_0 = 4.25$ である (Acta Chimica Hungarica-Models in Chemistry 129 (5) 671-683 1992)。調整されるpHはヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、凍結及び解凍の条件、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、本発明では、pH3.5以下に調整することが必要である。好ましくは、pH2.5以下である。

凍結、解凍はヒアルロン酸の調整された酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を少なくとも1回行う。凍結、解凍の温度と時間は、容器の大きさ、水溶液量によりヒアルロン酸の酸性水溶液が凍結、解凍する温度と時間の範囲内で適宜決められるが、一般には、氷点以下の凍結温度、氷点以上の解凍温度が好ましい。

凍結、解凍時間を短くできることから、更に好ましくは -5°C 以下の凍結温度、 5°C 以上の解凍温度が選ばれる。また、時間は、その温度で凍結、解凍が終了する時間以上であれば特に制限されない。

ヒアルロン酸の調整された酸性水溶液を凍結し、次いで解凍する操作の繰り返し回数は、使用するヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、水溶液のpH、凍結及び解凍の温度と時間、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められる。通常は1回以上繰り返すことが好ましい。

また、凍結、解凍の操作を繰り返すごとに、その凍結、解凍の温度及び時間を変えても構わない。

ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結解凍により得られたヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の酸加水分解を避けるために、酸性に調整するために用いた酸等の成分を除く必要がある。酸等の成分を除くためには、通常は水性溶媒によって洗浄する。ヒアルロン酸ゲルの機能を損なわないものであれば特に制限はないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられるが、好ましくは、生理食塩水、リン酸緩衝液等が用いられる。

また、洗浄方法は、特に制限はないが、通常は、バッチ法、濾過法、カラム等に充填して通液する方法等が用いられる。これらの洗浄条件は、洗浄液量、回数等を含めて、除きたい成分を目標の濃度以下にできる条件であればよく、ヒアルロン酸ゲルの形態や用途により適宜選択することが可能である。

この洗浄されたヒアルロン酸ゲルは、その使用目的に応じて、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿潤状態、風乾、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態で医用材料として供される。

ヒアルロン酸ゲルの成形加工等の処理は、作製時には、ヒアルロン酸の調整された酸性溶液の凍結時の容器や手法の選択によりシート状、フィルム状、破碎状、スポンジ状、塊状、繊維状、及びチューブ状の所望の形態のヒアルロン酸ゲルの作製が可能である。例えば、板上にキャストして凍結することによりフィルム状及びシート状の形態が得られるし、水と混和しない有機溶剤と激しく混合攪拌しながら凍結解凍することにより破碎状の形態が得られる。

ヒアルロン酸ゲルの作製後の加工としては、機械的粉碎による微細な破碎状や、圧延によるフィルム化、紡糸等が例示される。一方、特に成形加工のための処理を行わなくても、適切な作製条件を選ぶことにより目的の形状のヒアルロン酸ゲルが得られる場合もある。例えば、ヒアルロン酸濃度が0.1%以下、好まし

くは0.05%以下の調整された酸性溶液の凍結解凍により、微細繊維片状のヒアルロン酸ゲルが得られる。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、一般の生体内分解性医用材料及びヒアルロン酸が用いられる分野であれば特に制限なく使用することができる。例えば、癒着防止剤、薬理活性物質の担体、創傷被覆剤、人工皮膚、組織置換型生体組織修復剤、関節注入剤、外科手術用縫合糸、止血剤、人工臓器、人工細胞外マトリックス又は人工基底膜、診断・治療に用いる医療器具・医療用具等の生物医学的製品又は医薬組成物への使用が挙げられる。

ヒアルロン酸ゲルの各種成形加工品は、単一形態での使用は当然ながら、異なるヒアルロン酸ゲル形態との混合又は併用、更にゲル化されていないヒアルロン酸との混合又は併用による組合せ処方により効果の増強が期待できる。

例えば、腹腔内術後癒着防止剤としてシート状ヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液の併用による効果は、局所効果と腹腔内全体効果が期待できる。

また、関節注入剤として破砕状ヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液の混合による効果は、即時効果と遅延効果が期待できる。

以下に、本発明で得られたヒアルロン酸ゲルの医用材料としての有用性を、薬理活性物質の徐放用担体としての使用を例に挙げて説明する。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、その構造中に薬理活性物質を包含させてその薬理活性物質を徐放化させる担体として用いることが可能である。この場合、薬理活性物質の種類、使用形態、使用部位、必要持続時間に応じてヒアルロン酸ゲルの分解性に代表される性質や形状をコントロールすることにより、種々の薬理活性物質に、また、種々の使用形態に適用可能となる。

適当な製剤化と併せて、目的に応じた薬理活性物質の放出が可能な医薬品製剤が得られる。徐放化製剤の投与方法としては、経口、経皮、経粘膜、注射、及び体内埋込等が挙げられる。

次に、本発明の癒着防止剤について説明する。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤は、シート状、フィルム状、破砕状、スポンジ状、塊状、繊維状、及びチューブ状等の形態で外科手術に用いられる。用いられる形態としては、フィルム状又はシート状として外科手術部位

に直接貼付するのが好ましい。または、微細破碎状として注射器で外科手術部位に塗布するのが好ましい。または、ゲル又はフィルム状として腹腔鏡で手術部位に塗布するのが好ましい。

さらに、ヒアルロン酸の調整された酸性溶液に生理活性物質を混合した後に凍結解凍を行うことにより、生理活性物質を包含したヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を得ることも可能である。

ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤は、癒着が生じるいかなる動物にも適用でき、哺乳動物、特に人間に於いて好適に手術後の癒着を防止することができる。

生体内の投与場所は腹腔、胸腔内の各種臓器、腱鞘、頭蓋、神経、及び眼球、等に係わる、腹部手術、婦人科手術、胸部手術、腱や靱帯に係わる整形外科手術、硬膜に係わる神経外科手術、等どこでも有用である。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤の投与時期は、術後の癒着を防止できるどの時期でも良く、手術中又は手術終了時に投与できるが、特に手術終了の直前に投与するのが好ましい。

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

実施例 1

分子量が 2×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、1重量%のヒアルロン酸の水溶液を調整した。調整されたヒアルロン酸の水溶液のpHは、6.0であった。この水溶液のpHを、1N塩酸でpH1.5に調整した。ヒアルロン酸の酸性水溶液15mlを30mlのガラスビンに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。16時間放置した後、 25°C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

実施例 2

実施例1に於いて、ヒアルロン酸濃度を0.1重量%にしてヒアルロン酸の水溶液を調整した。そして、実施例1と同様の操作を行った。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

実施例 3

実施例1に於いて、分子量が 6×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを

溶解してヒアルロン酸の水溶液を調整した。実施例 1 と同様に調整し、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。6 時間以上の凍結と 25°C で 2 時間以上の解凍を 5 回繰り返した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

実施例 4

実施例 1 に於いて、凍結温度を -10°C に設定した。77 時間その雰囲気中で放置した後、 25°C で解凍した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

実施例 5

実施例 1 に於いて、0.4 重量%のヒアルロン酸の水溶液から、 $\text{pH} 2.5$ のヒアルロン酸の酸性水溶液を調整した。ヒアルロン酸の酸性水溶液 15 ml を 30 ml のガラスビンに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。6 時間以上の凍結と 25°C で 2 時間以上の解凍を 8 回繰り返した。その結果、部分的にスポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。

比較例 1

実施例 1 に於いて、ヒアルロン酸の水溶液の pH を調整せずに、凍結し、解凍することを 8 回繰り返した。その結果、ヒアルロン酸の水溶液の変化は起こらなかった。すなわち、ゲル化しなかった。

比較例 2

実施例 1 で調整したヒアルロン酸の水溶液を使って、 60°C で風乾し、厚さ約 $100\ \mu\text{m}$ のキャストフィルムを得た。該キャストフィルムをヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

比較例 3

実施例 1 で調整したヒアルロン酸の水溶液を -20°C で凍結し、凍結乾燥してスポンジ状のヒアルロン酸を得た。該スポンジ状のヒアルロン酸をヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

実施例 6

ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験

生理的食塩水に 50 mM 濃度でリン酸緩衝成分を加え、 $\text{pH} 7$ のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを

蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で150mgのヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルに対して、50mlのリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸ゲルをリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

また、比較例のヒアルロン酸固形物は、乾燥重量で150mgを50mlのリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

そして、25℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

従って、中性の25℃の水溶液中でのヒアルロン酸ゲルの溶解性は、上記試験により規定されるものである。

ヒアルロン酸濃度の測定

リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸の濃度は、GPCを使って、示差屈折率検出器のピーク面積から求めた。

上記に従い、具体的に実施例1～4のヒアルロン酸ゲル及び比較例2、3のヒアルロン酸固形物の溶解性試験を行った。その結果をヒアルロン酸ゲルの形態の目視による観察結果とともに表1に示す。

例えば、実験No. 1の実施例1で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率を調べると、1日経過後では、3%の溶解率であり、4日経過後では5%の溶解率であり、更に7日経過後では6%の溶解率であった。

即ち、7日経過しても94%のヒアルロン酸ゲルが残存していた。スポンジ状の形態も保持されていた。それに対して、実験No. 5の比較例2で得られた厚さ約100μmのキャストフィルムの溶解率を調べると、1日経過後では、100%の溶解率であり、完全に溶解した。

4日経過後、及び7日経過後も100%溶解している状態を維持していた。

よって、比較例（実験No. 5～6）で得られたヒアルロン酸固形物の水中での溶解速度が極めて速いのに対して、本願発明で得られたヒアルロン酸ゲル（例えば、実験No. 1～4）の水中での溶解速度が極めて遅いことが見出される。

これより、本願発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、生体内滞留時間が長いことが示唆される。

表 1

実験 No	ヒアルロン酸ゲルの溶解率（上段 %）と形態（下段）				備考
	1 日後	4 日後	7 日後	1 4 日後	
1	3 スポンジ状	5 スポンジ状	6 スポンジ状	10 スポンジ状	実施例 1
2	2 スポンジ状	4 スポンジ状	6 スポンジ状	15 スポンジ状	実施例 2
3	9 スポンジ状	14 スポンジ状	28 スポンジ状	38 スポンジ状	実施例 3
4	3 スポンジ状	5 スポンジ状	7 スポンジ状	11 スポンジ状	実施例 4
5	100（完全溶解）	1 日後の 状態維持	1 日後の 状態維持	1 日後の 状態維持	比較例 2
6	100（完全溶解）	〃	〃	〃	比較例 3

比較例 4

分子量が 2×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムの粉末を、ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

比較例 5

分子量が 2×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムの粉末を、加圧成形し

円盤状のペレットを得た。該ペレットをヒアルロン酸ゲルの溶解性試験に用いた。

実施例 7

ヒアルロン酸ゲルの溶解性試験

生理的食塩水に 50 mM 濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。上記の実施例で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で 20 mg のヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルに対して、50 ml のリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、ヒアルロン酸ゲルをリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

また、比較例のヒアルロン酸固形物は、乾燥重量で 20 mg を 50 ml のリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。

そして、37℃で攪拌下のリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

従って、中性の 37℃の水溶液中でのヒアルロン酸ゲルの溶解性は、上記試験により規定されるものである。

上記に従い、具体的に実施例 1～4 のヒアルロン酸ゲル及び比較例 2～5 のヒアルロン酸固形物の溶解性試験を行った。その結果を表 2 に示す。

表 2

実験 No.	ヒアルロン酸ゲルの溶解率 (%)			備考
	6 時間後	1 2 時間後	2 4 時間後	
7	1 2	1 4	1 6	実施例 1
8	1 2	1 6	1 9	実施例 2
9	1 3	2 2	2 3	実施例 3
1 0	1 2	1 5	1 8	実施例 4
1 1	1 0 0 (完全溶解)	6 時間後の 状態維持	6 時間後の 状態維持	比較例 2
1 2	1 0 0 (完全溶解)	〃	〃	比較例 3
1 3	1 0 0 (完全溶解)	〃	〃	比較例 4
1 4	1 0 0 (完全溶解)	〃	〃	比較例 5

例えば、実験 No. 7 の実施例 1 で得られたヒアルロン酸ゲルの溶解率を調べると、1 2 時間経過後では、1 4 % の溶解率であり、2 4 時間経過後では、1 6 % の溶解率であった。即ち、2 4 時間経過しても、8 4 % のヒアルロン酸ゲルが残存していた。それに対して、実験 No. 1 1 の比較例 2 で得られた厚さ約 1 0 0 μ m のキャストフィルムの溶解率を調べると、6 時間経過後では、1 0 0 % の溶解率であり、完全に溶解した。

よって、比較例（実験 No. 1 1 ～ 1 4）で得られたヒアルロン酸固形物の水中での溶解速度が極めて速いものに対して、本願発明で得られたヒアルロン酸ゲル（例えば、実験 No. 7 ～ 1 0）の水中での溶解速度が極めて遅いことが見いだされる。これより、本願発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、生体内滞留時間が長いことが示唆される。

実施例 8

ヒアルロン酸ゲルの可溶化試験

蒸留水を塩酸でpH 1.5に調整した。実施例1で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、続いて実施例6記載のリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬、洗浄し、続いて蒸留水で洗浄した。洗浄したヒアルロン酸ゲルを凍結乾燥した。乾燥重量で15mgのヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルをpH 1.5の水溶液15mlに浸漬した。この溶液を60℃に設定したオープン中に放置した。2時間後、6時間後、12時間後に0.5mlずつ溶液をサンプリングした。6時間後に目視で確認できるヒアルロン酸ゲルはほとんど消失していた。

比較例6

分子量が 2×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、0.1重量%のヒアルロン酸の水溶液を調整した。この水溶液のpHを、1N塩酸でpH 1.5に調整した。このヒアルロン酸の酸性水溶液15mlを、60℃オープン中に4時間放置し、直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解を行った。

実施例9

可溶化ヒアルロン酸の分子量と分岐度の測定

実施例8で可溶化されたヒアルロン酸と比較例6で得られた直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解物は、GPC溶媒で2倍に希釈して濃度を0.05重量%に調製し、0.2 μ mのメンブランフィルターでろ過した後、0.1ml注入してGPC-MALLSの測定を行った。

GPCカラムとして昭和電工社製SB806HQを1本、示差屈折率検出器として日本分光社製830-R1、MALLSはWyatt社製DAWNDSPEFを使用して、溶媒硝酸ナトリウムの0.2M水溶液、測定温度40℃、流速0.3ml/分、データ取得間隔1回/2秒で測定した。散乱強度の測定は散乱角度21.7°～90°の8検出器を使った。データ処理ソフトウェアはWyatt社製ASTRA Version 4.10を使用した。

上記に従い、実施例8で可溶化されたヒアルロン酸と比較例6で得られた直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解物の測定を行った。測定結果を表3に示す。

表 3

実験 No.	反応時間 (時間)	重量平均 分子量	分子量分布 Mw/Mn	可溶化率 (%)	備考
15	2	36.8万	1.8	28	実施例8
16	6	37.8万	2.4	86	実施例8
17	12	10.7万	1.8	97	実施例8
18	4	24.7万	1.6	—	比較例6

例えば、実験No. 15の実施例8で反応時間2時間でサンプリングした場合、ヒアルロン酸ゲルの可溶化率が小さい。実験No. 17の反応時間12時間でサンプリングした場合、分子量が大きく低下し分岐度測定が困難になる。実験No. 16の反応時間6時間でサンプリングした場合、ヒアルロン酸ゲルの可溶化率も大きく、分岐点を有するヒアルロン酸の存在を反映して分子量分布も2.4と大きくなっている。

実験No. 16の実施例8で反応時間6時間でサンプリングした可溶化されたヒアルロン酸と実験No. 18の比較例6で得られた直鎖状ヒアルロン酸の酸加水分解物のGPCクロマトグラムと分岐度の計算結果を図1及び図2に示す。

図1から、実施例8のGPCクロマトグラム1は比較例6のGPCクロマトグラム2と比較して、高分子量側にショルダーがあることがわかる。同一溶出体積のフラクションの分子量を比較すると、実施例8では溶出体積8.6ml以下、分子量で約20万以上の領域で比較例6よりも明確に大きな分子量を有することがわかる。

実施例8では、分岐点が存在するため、比較例6と比べて、同一溶出体積のフラクションの分子量が大きくなっている。

図2に比較例6を直鎖状ヒアルロン酸として計算した実施例8の分岐度と分子量の関係を示した。すなわち、分岐度は図1の同一溶出体積のフラクションの両

者の分子量から（２）式とく３）式を使って計算した。

図２から、実施例８の分岐度は分子量約２０万以上の領域で、分岐度０．５以上から急速に増大していくことがわかる。本発明で得られたヒアルロン酸ゲル中に、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造が含まれていることがわかる。

実施例１０

ヒアルロン酸ゲルのアルカリ性緩衝水溶液中での浸漬試験

実施例１で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、続いて実施例６記載のリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬、洗浄し、次いで蒸留水で洗浄した。乾燥重量で１５０ｍｇのヒアルロン酸を含む洗浄ヒアルロン酸ゲルに対して、５０ｍｌのｐＨ１１のリン酸水素二ナトリウム－水酸化ナトリウム２５ｍＭ緩衝液に浸漬し２５℃で放置したところ、速やかに溶解し、１時間後には完全に溶解した。また同様に、ｐＨ１０の炭酸水素ナトリウム－水酸化ナトリウム２５ｍＭ緩衝液に浸漬したところ、７時間後には形態が崩れて１８時間後には完全に溶解した。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、中性の水溶液中では難溶性であるが、アルカリ性水溶液中では速やかに溶解する特徴を有することがわかった。

実施例１１

ヒアルロン酸ゲルの膨潤度測定

実施例１で得られたスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、続いて実施例６記載のリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬、洗浄し、次いで蒸留水で洗浄した。その後、洗浄したヒアルロン酸ゲルを凍結乾燥した。

乾燥重量で１００ｍｇのヒアルロン酸ゲルを蒸留水２００ｍｌに浸漬し、室温で２４時間放置した。取りだした膨潤したヒアルロン酸ゲルをろ紙上で脱水し、膨潤したヒアルロン酸ゲルの重量を測定した。膨潤倍率は１１７倍だった。

本発明で得られたヒアルロン酸ゲルは、膨潤倍率が測定可能な安定性を有していることがわかった。

実施例１２

ヒアルロン酸ゲルの細胞毒性試験

正常ヒト皮膚由来線維芽細胞培養において本発明で得られたヒアルロン酸ゲルを非接触下で共存させ、細胞増殖挙動の観察によりその細胞毒性を評価した。実施例 1 の方法で作製したスポンジ状のヒアルロン酸ゲルを実施例 8 と同じ処理により凍結乾燥体とした。その凍結乾燥体を機械的に粉碎したちの 20 mg をファルコン社製のセルカルチャーインサート（ポアサイズ：3 μ m）中に入れ、細胞を播種した培地に浸した。また、ヒアルロン酸ゲル非共存下での培養をコントロールとした。

培養条件 プレート：細胞培養用 12 ウェルプレート

培地：DMEM 培地 + 10 % ウシ胎児血清, 2 ml / ウェル

温度：37℃（5% CO₂ 下）

播種細胞数：1 × 10⁴ 個 / ウェル

培養開始後 2 日、5 日、8 日後に、細胞密度を倒立顕微鏡を用いて観察したところ、ヒアルロン酸ゲルが共存していてもコントロールと同様に良好な増殖を示し、本発明で得られたヒアルロン酸ゲルには細胞毒性作用がないことが確認された。

実施例 13

分子量が 2 × 10⁶ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、1 重量 % のヒアルロン酸水溶液を調整した。この水溶液の pH を、1 N 塩酸で pH 1.5 に調整し、ヒアルロン酸酸性水溶液を得た。このヒアルロン酸酸性水溶液 25 ml を、プラスチック製シャーレに入れ、-20℃ に設定した冷凍庫に入れた。22 時間の凍結と 25℃ で 2 時間の解凍を 2 回繰り返し、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれを生理的食塩水に 50 mM 濃度でリン酸緩衝成分を加えて調整した pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水 100 ml に 5℃ で 24 時間浸漬し中和した後、蒸留水で十分に洗浄した。そしてこれを 2 枚の板に挟んで圧延し、凍結乾燥した。その結果、シート状のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を得た。

実施例 14

分子量が 6 × 10⁶ ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを用いた以外は、実施例 13 と同様な操作を行った。その結果、シート状のヒアルロン酸ゲルの癒着防

止剤を得た。

実施例 15

実施例 13 で調整した分子量 2×10^6 ダルトン、pH 1.5 のヒアルロン酸酸性水溶液 25 ml を、プラスチック製シャーレに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。22 時間の凍結と 25°C で 2 時間の解凍を 2 回繰り返す、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれを実施例 13 と同様にリン酸緩衝生理的食塩水の浸漬、洗浄した後、2 枚の板に挟み圧延し、これをオープンにより 40°C で 3 時間風乾した。その結果、フィルム状のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を得た。

実施例 16

実施例 13 で得られたシート状のヒアルロン酸ゲル 50 mg を無菌的に 10 ml 生理的食塩水に入れ、マイクロホモジナイザー (POLYTORON、KINEMATICA AG 製) にて粉碎し、破砕状のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を得た。

実施例 17

実施例 13 で調整した分子量 2×10^6 ダルトン、pH 1.5 のヒアルロン酸酸性水溶液 15 ml を 30 ml の容器に入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。22 時間の凍結と 25°C で 2 時間の解凍を 2 回繰り返す、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれを生理的食塩水に 50 mM 濃度でリン酸緩衝成分を加えて調整した pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水 100 ml に 5°C で 24 時間浸漬し中和した後、蒸留水で十分に洗浄した。そしてこれをそのまま凍結乾燥した。その結果、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を得た。

実施例 18

実施例 13 で調整した分子量 2×10^6 ダルトン、pH 1.5 のヒアルロン酸酸性水溶液 15 ml を 30 ml の容器に入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。22 時間の凍結と 25°C で 2 時間の解凍を 2 回繰り返す、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれを実施例 13 と同様にリン酸緩衝生理的食塩水の浸漬、洗浄し、遠心脱水で押し固めたまま凍結乾燥した。その結果、塊状のヒアルロン酸ゲルの医用材料を得た。

実施例 19

分子量 2×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、0.05%にし、さらに1N塩酸でpH1.5に調整したヒアルロン酸酸性水溶液100mlを200mlの容器に入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。

22時間の凍結と 25°C で2時間の解凍を2回繰り返し、繊維状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれをろ過により回収し、実施例13と同様にリン酸緩衝生理的食塩水の浸漬、洗浄、凍結乾燥した。その結果、繊維状のヒアルロン酸ゲルの医用材料を得た。

実施例 20

実施例13で調整した分子量 2×10^6 ダルトン、pH1.5のヒアルロン酸酸性水溶液5mlを、チューブ状の型に流し込み、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。22時間の凍結と 25°C で2時間の解凍を2回繰り返し、チューブ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれを実施例13と同様にリン酸緩衝生理的食塩水の浸漬、洗浄、凍結乾燥した。その結果、チューブ状のヒアルロン酸ゲルの医用材料を得た。

実施例 21

実施例13で調整した分子量 2×10^6 ダルトン、pH1.5のヒアルロン酸酸性水溶液25mlを、プラスチック製シャーレに入れ、 -20°C に設定した冷凍庫に入れた。22時間の凍結と 25°C で2時間の解凍を2回繰り返し、スポンジ状のヒアルロン酸ゲルが得られた。次にこれを実施例13と同様にリン酸緩衝生理的食塩水の浸漬、洗浄し、軽く脱水後、1重量%のヒアルロン酸水溶液5mlを加えこれを含ませたまま2枚の板に挟んで圧延し、凍結乾燥した。その結果、ヒアルロン酸を併用するシート状のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を得た。

比較例 7

実施例13で調整したヒアルロン酸水溶液を使って、pHを1N水酸化ナトリウムで7.0に調整し、その25mlをプラスチック製シャーレに入れて -20°C で凍結し、凍結乾燥してシート状のヒアルロン酸を得た。

比較例 8

実施例13で調整したヒアルロン酸水溶液を使って、pHを1N水酸化ナトリ

ウムで7.0に調整し、その25mlをプラスチック製シャーレに入れて60℃で風乾し、シート状のヒアルロン酸を得た。

比較例 9

実施例13で調整したヒアルロン酸水溶液を使って、pHを1N水酸化ナトリウムで7.0に調整し、その25mlをビーカーに入れて-20℃で凍結し、凍結乾燥してスポンジ状のヒアルロン酸を得た。

比較例 10

1. 1gのリン酸水素二ナトリウム水和物を30gの水に溶解し、2%の水酸化ナトリウムでpH10に調整した溶液に分子量 6×10^6 ダルトンのヒアルロン酸ナトリウム0.6gを溶解した。次に、塩化シアヌール0.05gを1.5mlのジオキサンに溶解し、上記ヒアルロン酸溶液に添加し、3時間室温で反応させた。その後、透析膜に入れ、1日間水に対して透析し、型枠のついたガラス板上に流し込み乾燥して、フィルムを得た。

実施例 22

ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料の溶解性試験

生理的食塩水に50mM濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH7のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。乾燥重量で150mgのヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料を、50mlのリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬し緩やかに浸漬した。25℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料の溶解性をその形態から求めた。

上記に従い、具体的に実施例13～21及び比較例7～9のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料の溶解性試験を行った。その結果を表4に示す。

表 4

実験 No	ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び 医用材料の形態			備考
	1 日後	4 日後	7 日後	
1 9	不変	不変	一部溶解	実施例 1 3
2 0	不変	一部溶解	一部溶解	実施例 1 4
2 1	不変	不変	一部溶解	実施例 1 5
2 2	不変	一部溶解	一部溶解	実施例 1 6
2 3	不変	不変	不変	実施例 1 7
2 4	不変	不変	不変	実施例 1 8
2 5	不変	不変	一部溶解	実施例 1 9
2 6	不変	不変	一部溶解	実施例 2 0
2 7	不変	一部溶解	一部溶解	実施例 2 1
2 8	完全溶解	1 日後の 状態維持	1 日後の 状態維持	比較例 7
2 9	完全溶解	〃	〃	比較例 8
3 0	完全溶解	〃	〃	比較例 9

表 4 より、実施例（実験 No. 1 9～2 7）のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料は、比較例（実験 No. 2 8～3 0）の単なるヒアルロン酸をシート状、スポンジ状に成形したものが 1 日で中性の 2 5℃の水溶液中で完全溶解してしまうのに比較して、7 日後でも一部溶解または不変であることがら、1 日以上形態を保持することが示唆された。

実施例 2 3

ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料の溶解性試験

生理的食塩水に 5 0 mM 濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH 7 のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。乾燥重量で 1 5 0 m g のヒアルロン酸を含むヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料を、5 0 m l のリン酸緩衝生理的食塩水に浸漬し緩やかに攪拌した。3 7℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン

酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

ヒアルロン酸濃度の測定

リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸の濃度は、GPCを使って、示差屈折率検出器のピーク面積から求めた。

上記に従い、具体的に実施例 13～21 及び比較例 7～9 のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料の溶解性試験を行った。その結果を表 5 に示す。

表 5

実験 No	ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び 医用材料の溶解率 (%)				備考
	12 時間後	1 日後	4 日後	7 日後	
31	6	15	24	29	実施例 13
32	15	21	38	55	実施例 14
33	6	18	26	35	実施例 15
34	8	21	29	40	実施例 16
35	8	16	22	28	実施例 17
36	6	15	20	26	実施例 18
37	8	15	26	32	実施例 19
38	8	14	24	30	実施例 20
39	12	21	30	36	実施例 21
40	100	100	100	100	比較例 7
41	100	100	100	100	比較例 8
42	96	100	100	100	比較例 9

表 5 より、実施例（実験 No. 31～39）のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤及び医用材料は、比較例（実験 No. 40～42）の単にヒアルロン酸をシート状、スポンジ状に成形したものが 12 時間で 37℃ のリン酸緩衝生理的食塩水に 96～100% の溶解率であるのに比較して、7 日後でも 26～55% の溶解率であり、難水溶性であることが示唆された。

実施例 2 4

ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤の生体適合性試験及び生体内滞留性試験

実施例 1 3 及び実施例 1 4 で得られたシート状のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を、1 cm×1 cmの正方形に裁断したもの、コントロールとして、比較例 7 で得られたシート状ヒアルロン酸を1 cm×1 cmの正方形に裁断したもの、及び比較例 1 0 で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸を1 cm×1 cmの正方形に裁断したものを以下の試験に供した。

1 2 週令の雌性DDYマウス（平均体重33 g）20匹のうち、5匹をヒアルロン酸ゲル（分子量 2×10^6 ダルトン）、5匹をヒアルロン酸ゲル（分子量 6×10^6 ダルトン）、比較例として5匹を凍結乾燥ヒアルロン酸、残り5匹を塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸の埋め込みに用いた。

埋め込みは、マウスをネブタール麻酔後、腹部正中線に沿って約1.5 cm切開し、各種ヒアルロン酸を盲腸に乗せて縫合することにより行った。

埋め込みから3、5、7、9、14日目に、ヒアルロン酸ゲル埋め込みマウスと、凍結乾燥ヒアルロン酸埋め込みマウスをそれぞれ1匹ずつ頸椎脱臼致死後、腹部を切開し、埋め込み部の状態の観察を行った。その後、腹腔内を生理食塩水により洗浄し、残存ヒアルロン酸をシート部分も含めて回収した。

この回収液に等量の0.02 Nの水酸化ナトリウムを加えて1時間静置後、塩酸を加えて中和した。次いで、遠心分離し、フィルター（ポアサイズ0.45 μ m）濾過により調製した。そして、得られた試料のGPC分析により、回収液中のヒアルロン酸を定量した。ヒアルロン酸回収率を埋め込んだシート中のヒアルロン酸量を基準として算出した結果を、埋め込み部の状態の観察結果と併せて表 6 に示す。

表 6

実験 No	埋め込みシート	埋込後 日数	ヒアル ロン酸 回収率 (%)	シート の状態	組織の 状態
4 3	実施例 1 3 の ヒアルロン酸ゲル (分子量 2×10^6)	3	8 3	原形を保持	○
		5	6 3	原形を保持	○
		7	2 8	断片化	○
		9	1 5	僅かに残存	○
		1 4	0	発見できず	○
4 4	実施例 1 4 の ヒアルロン酸ゲル (分子量 6×10^6)	3	5 9	原形を保持	○
		5	1 3	僅かに残存	○
		7	2	僅かに残存	○
		9	0	発見できず	○
		1 4	0	発見できず	○
4 5	比較例 7 の凍結乾燥 ヒアルロン酸	3	0	発見できず	○
		5	0	発見できず	○
		7	0	発見できず	○
		9	0	発見できず	○
		1 4	0	発見できず	○
4 6	比較例 1 0 の 塩化シアヌール 架橋ヒアルロン酸	3	7 3	原形を保持	△
		5	4 6	原形を保持	△
		7	1 0	僅かに残存	△
		9	0	発見できず	△
		1 4	0	発見できず	△

(註) ○：異常なし △：軽微な炎症

どのマウスも正常に生育したが、組織の状態はヒアルロン酸ゲル及び凍結乾燥ヒアルロン酸が埋め込み局所の組織の状態に異常は見られなかったのに対し、比較例 1 0 で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸では組織の軽微な炎症が認められた。

実施例 25

ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤のマウス子宮モデルによる癒着防止効果試験

実施例 13 で得られたヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を、1 cm×2 cmの長方形に裁断したもの、同様に実施例 13 で得られたヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤に実施例 13 で調整したヒアルロン酸溶液を添加したもの、コントロールとして、比較例 7 で得られたシート状ヒアルロン酸、実施例 13 で調整したヒアルロン酸溶液及び比較例 10 で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸を 1 cm×2 cmの長方形に裁断したものを以下の試験に供した。

7 週令雌 ICR マウス（体重 25～30 g）を腹腔内ペントバルビタール注射で麻酔後正中切開にて開腹し、子宮角に約 10 mmの長さでヨードチンキ擦過塗布により損傷を加えた。各群 10 匹のマウスにコントロールとして無処置及び、それぞれ上記のヒアルロン酸ゲル、シート状のヒアルロン酸、及び塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸の 1 cm×2 cmの長方形のシートを損傷部位に巻き付け、また、ヒアルロン酸溶液の場合は、実施例 13 で調整したヒアルロン酸溶液 1 ml を損傷部位に添加し、さらにヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液を併用する場合は、先ずヒアルロン酸ゲルを損傷部位に巻き付け、腹腔内にヒアルロン酸溶液 1 ml を添加した。そしていずれの場合も 5-0 デキソンにて閉腹した。

術後 10 日目に、無処置、ヒアルロン酸ゲル、ヒアルロン酸ゲルとヒアルロン酸溶液の併用、シート状ヒアルロン酸、ヒアルロン酸溶液及び塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸を投与したマウスを各 10 匹を頸椎脱臼致死後、腹部を再開腹し、癒着形成の有無を判定した。癒着形成は、膜状のごく軽度の癒着は癒着と判定せず、繊維状で厚く、ピンセットで引っばても容易に引き剥がれない強い癒着を生じた場合を癒着と判定した。その結果を表 7 に示す。

表 7

実験 No	群	癒着の形成割合	備考
47	無処置	9/10	比較例
48	実施例13の ヒアルロン酸ゲル	1/10	実施例
49	実施例13のヒアルロ ン酸ゲルに実施例13 で調整したヒアルロン 酸溶液を添加	0/10	実施例
50	比較例7のシート状 ヒアルロン酸	5/10	比較例
51	実施例13で調整した ヒアルロン酸溶液	6/10	比較例
52	比較例10の 塩化シアヌール 架橋ヒアルロン酸	3/10	比較例

表7より、無処置で癒着の形成割合が10匹中9匹の時、単にヒアルロン酸をシート状に成形したものが、10匹中5匹、ヒアルロン酸溶液が10匹中6匹、及び塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸が10匹中3匹なのに比較して、実施例13のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤は10匹中1匹、及び実施例13で得られたヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤に実施例13で調整したヒアルロン酸溶液を添加したものは10匹中0匹と優れた癒着防止作用があることが示唆された。

実施例26

ヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤のラット盲腸モデルによる癒着防止効果試験

実施例13で得られたヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤を、2cm×2cmの正方形に裁断したもの、コントロールとして、比較例7で得られたシート状のヒア

ルロン酸、及び比較例 10 で得られた塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸を 2 cm × 2 cm の正方形に裁断したものを以下の試験に供した。

10 週令雄 Wistar ラット（体重約 250 g）を腹腔内にケタミン（60 mg / 体重 1 kg）とキシラジン（10 mg / 体重 1 kg）注射で麻酔後正中切開にて開腹し、盲腸に約 10 × 10 mm の領域をゲージで擦り（約 20 回）点状の出血が生じるまでの擦過傷をつくった。各群 5 匹のラットにコントロールとして無処置及び、それぞれ上記のヒアルロン酸ゲル、シート状ヒアルロン酸、塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸の 2 cm × 2 cm の長方形のシートを損傷部位に添付し、そして 3 - 0 デキソンにて閉腹した。

術後 14 日目に、無処置及びヒアルロン酸ゲル、シート状ヒアルロン酸、塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸を投与したラットを各 5 匹屠殺後、腹部を再開腹し、癒着形成の有無を判定した。癒着形成は、膜状のごく軽度の癒着は癒着と判定せず、繊維状で厚く、ピンセットで引っぱでも容易に引き剥がれない強い癒着を生じた場合を癒着と判定した。その結果を表 8 に示す。

表 8

実験 No	群	癒着の形成割合	備考
53	無処置	4 / 5	比較例
54	実施例 13 の ヒアルロン酸ゲル	1 / 5	実施例
55	比較例 7 のシート状 ヒアルロン酸	3 / 5	比較例
56	比較例 10 の 塩化シアヌール 架橋ヒアルロン酸	2 / 5	比較例

表 8 より、無処置で癒着の形成割合が 5 匹中 4 匹の時、単にヒアルロン酸をシ

ート状に成形したものが、5匹中3匹、及び塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸が5匹中2匹なのに比較して、実施例13のヒアルロン酸ゲルの癒着防止剤は5匹中1匹と優れた癒着防止作用があることが示唆された。

産業上の利用の可能性

以上、本発明によれば、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、難水溶性のヒアルロン酸のゲルが得られる。化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することに起因する生体適合性への悪影響が避けられ、生体内滞留時間が長いので生体適合性材料分野に有用である。特に本発明の難水溶性のヒアルロン酸ゲルにより、(1)癒着防止剤として理想的な生体内貯留性が得られる、(2)創面での滞留時間を大幅に改善することで術後癒着を顕著に抑制できる、(3)更に、従来の化学的な改質ヒアルロン酸の問題点であった毒性や生体適合性へ問題を完全に解決することができる極めて安全性が高い、等の優れた癒着防止剤を提供することができる。

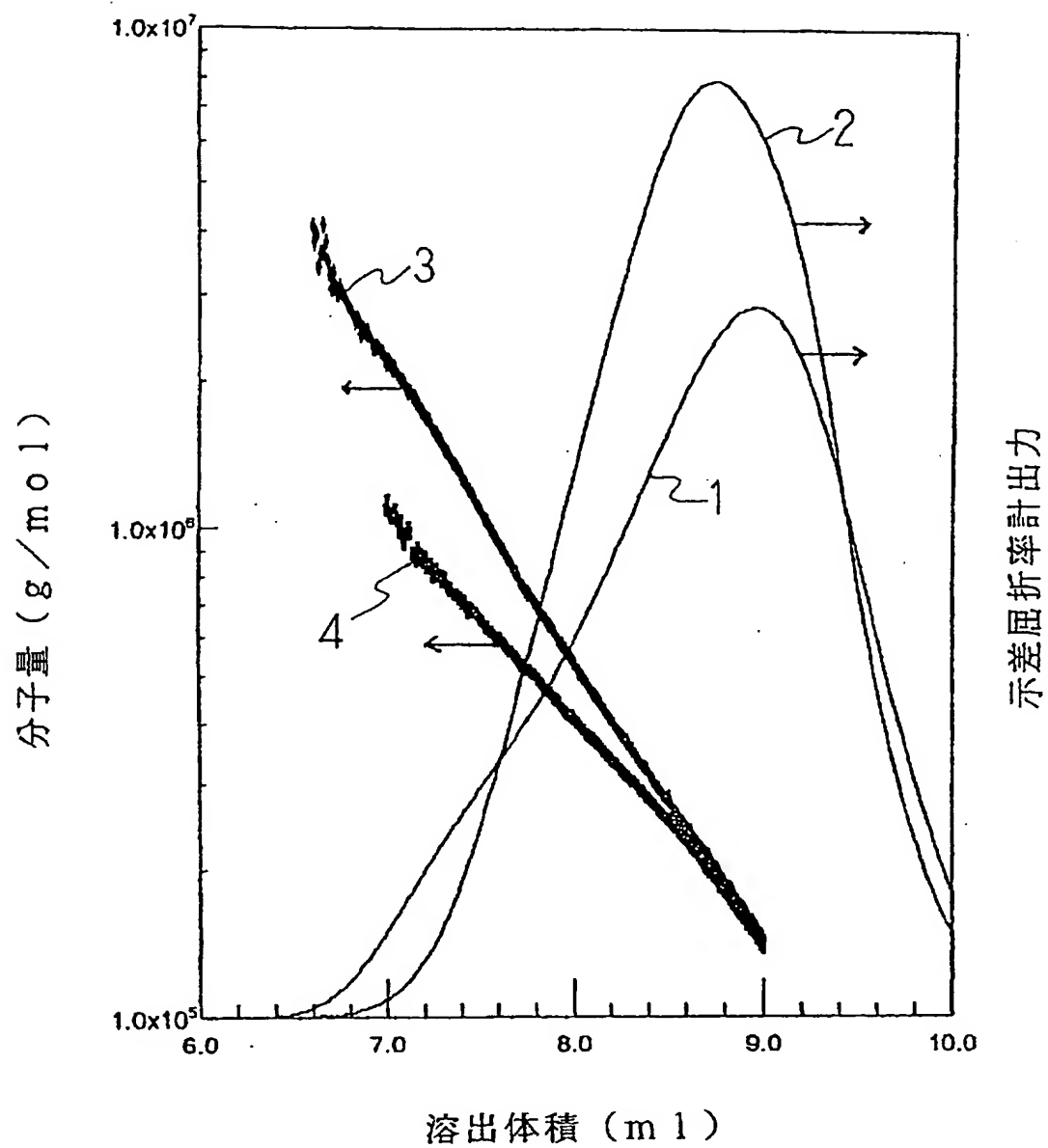
【図面の簡単な説明】

図1は、実施例8と比較例6のGPCクロマトグラムと各フラクションの分子量を対比したグラフである。

図2は、比較例6を直鎖状ヒアルロン酸として計算した実施例8の分岐度と分子量の関係を示すグラフである。

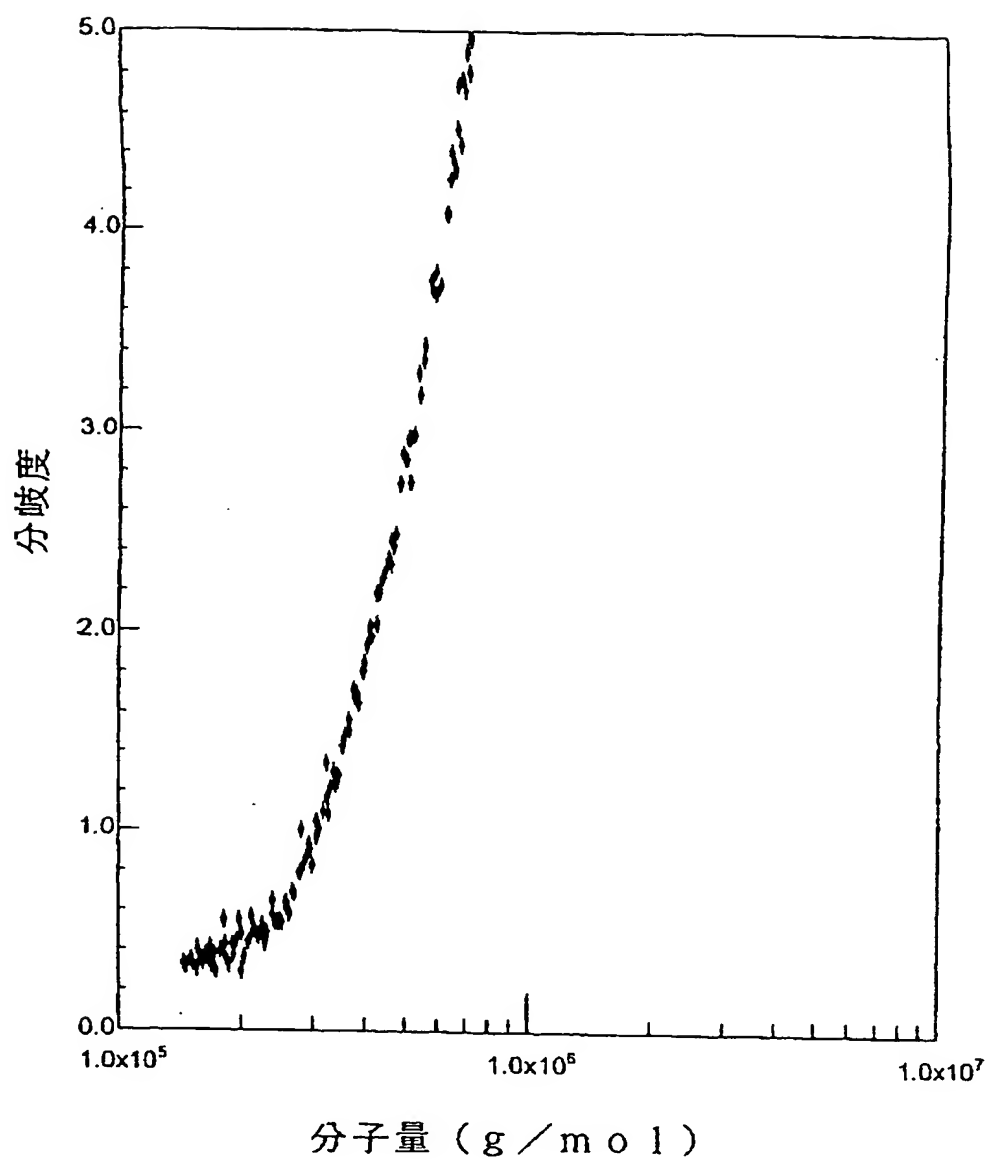
【図1】

第1図



【図 2】

第2図



【国際調査報告】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 98/03536	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁸ C08B37/08, A61L27/00, A61L15/01, A61L31/00			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int. Cl ⁸ C08B37/08, A61L27/00, A61L15/01, A61L31/00			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
A	J P, 50-56436, A (工業技術院長), 17.5月. 1975 (17.05.75)、(ファミリーなし)	1-12	
A	J P, 5-58881, A (株式会社資生堂), 9.3月. 1993 (09.03.93)、(ファミリーなし)	1-12	
A	J P, 7-102002, A (グンゼ株式会社), 18.4月. 1995 (18.04.95)、(ファミリーなし)	1-12	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 05.10.98		国際調査報告の発送日 13.10.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 山本 龍二	4C 7433
		電話番号 03-3581-1101 内線 3452	

様式 PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), UA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 大島 和宏

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 総合研究所内

(72)発明者 橋本 正道

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 総合研究所内

(72)発明者 新井 一彦

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化学工業株式会社 総合研究所内

(72)発明者 澤田 富夫

愛知県名古屋市千種区山添町2丁目53番1号

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。